

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑯ EP 0 639 223 B1

⑯ DE 693 03 483 T 2

⑯ Int. Cl. 6:  
**C 12 M 3/00**  
B 01 L 3/00  
C 12 M 1/34

5, 296,375

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯

01.05.92 US 877536 01.05.92 US 877661  
01.05.92 US 877662 01.05.92 US 877701  
01.05.92 US 877702

⑯ Erfinder:

KRICKA, Larry, J., Berwyn, PA 19312, US; WILDING, Peter, Paoli, PA 19301, US

⑯ Patentinhaber:

The Trustees of the University of Pennsylvania,  
Philadelphia, Pa., US

⑯ Vertreter:

Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München

⑯ Benannte Vertragstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL

⑯ Mikrohergestellte Vorrichtungen zum Handhaben von Sperma

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

93 910 890.8

EP 0 639 223

### Hintergrund der Erfindung

Diese Erfindung betrifft im allgemeinen Verfahren und ein Apparat zur Durchführung von Analysen. Genauer betrifft die Erfindung die Gestaltung und den Aufbau von kleinen, typischerweise Einweg-Modulen, die in der Lage sind, schnell Mikrovolumina einer Fluid-Probe zu analysieren.

In den letzten Jahrzehnten hat die Fachwelt eine sehr große Anzahl von Protokollen, Test-Ausrüstungen bzw. Test-Kits und Test-Kassetten bzw. Test-Patronen zum Durchführen von Analysen an biologischen Proben für verschiedene Diagnostik- und Überwachungszwecke entwickelt. Immunoassays bzw. Immuno-Analysen, Agglutinations-Analysen und Analysen, die auf Polymerase-Kettenreaktionen, verschiedene Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen und unterschiedliche Migration von Spezien in einer komplexen Probe basieren, wurden alle verwendet, um die Gegenwart oder Konzentration von verschiedenen biologischen Verbindungen bzw. Zusammensetzungen oder Schadstoffen oder die Gegenwart von bestimmten Zelltypen zu bestimmen.

Kürzlich wurden kleine Einweg-Vorrichtungen entwickelt, um biologische Proben handzuhaben und um gewisse klinische Tests durchzuführen. Shoji et al. berichteten über die Verwendung einer kleinen Blutgas-Analyseeinrichtung, die auf einem Silizium-Wafer hergestellt wird. Shoji et al., Sensors and Actuators, 15: 101-107 (1988). Sato et al. berichteten über eine Zellen-Fusions-Technik, die mikromechanische Silizium-Bauteile bzw. Siliziumvorrichtungen verwenden. Sato et al., Sensors

and Actuators, A21-A23: 948-953 (1990). Ciba Corning Diagnostics Corp. (USA) stellten einen Mikroprozessor gesteuerten Laser-Photometer her, um Blutgerinnung festzustellen.

Mikromechanische Technologie hat ihren Ursprung in der Mikroelektronik-Industrie. Angell et al., Scientific American, 248: 44-55 (1983). Die Mikromechanik-Technologie ermöglichte die Herstellung von mikroentwickelten Vorrichtungen bzw. Bauelementen, die Struktur-Elemente mit minimalen Abmessungen aufweisen, die von einigen 10 Mikrometern (die Abmessung einer biologischen Zelle) bis zu Nanometer (die Abmessungen von manchen biologischen Makromolekülen) aufweisen. Dieser Größenbereich bzw. diese Skala wird hierin als "mesoskalisch" bezeichnet. Wirt-Experimente, die mesoskalische Strukturen mit einbeziehen, haben Studien der Mikromechanik mit einbezogen, d.h. mechanische Bewegung und Fließeigenschaften. Die potentiellen Fähigkeiten von mesoskalischen Strukturen wurden nicht vollständig in der Wissenschaft des Lebens ausgenutzt.

Brunette (Exper. Cell Res., 167: 203-217 (1986) und 164: 11-26 (1986)) studierte das Verhalten von Fibroblasten und Epithelzellen in Gräben in Silizium, mit Titan überzogenen Polymeren und dergleichen. McCartney et al. (Cancer Res., 41: 3046-3051 (1981)) untersuchten das Verhalten von Tumorzellen in mit Rillen versehenen Plastik- bzw. Kunststoffsubstraten. LaCelle (Blood cells, 12: 179-189 (1986)) studierte Leukozyten- und Erythrozyten-Fluß in Mikrokapillaren, um einen Einblick in die Mikrozirkulation zu bekommen. Hung und Weissman berichteten über eine Studie über Fluid-Dynamiken in mikrohergestellten Kanälen, aber sie gaben keine Daten wieder, die mit einer analytischen Vorrichtung bzw. einem analytischen Bauelement in Beziehung stehen. Hung et al., Med. and Biol. Engineering, 9: 237-245 (1971); und Weissman et al., Am. Inst. Chem. Eng. J., 17: 25-30 (1971). Columbus et al. verwendeten eine Sandwichstruktur, die aus zwei senkrecht orientierten V-grubenförmig ausgebauchten Schichten bzw. Lagen besteht, bei der Steuerung des kapillaren Flusses von biologischen Fluiden zu diskreten ionenselektiven Elektroden in einer

experimentellen Multikanal-Testvorrichtung. Columbus et al., Clin. Chem., 33: 1531-1537 (1987). Masuda et al., und Washizu et al. berichteten über die Verwendung einer Fluid-Flußkammer zur Manipulation von Zellen (z.B. Zellfusion). Masuda et al., Proceedings IEEE/IAS Meeting, Seiten 1549-1553 (1987); und Washizu et al., Proceedings IEEE/IAS Meeting, Seiten 1735-1740 (1988). Die Fachwelt hat nicht vollständig das Potential der Verwendung mesoskalischer Vorrichtungen bzw. Bauelemente zur Analyse von biologischen Fluiden und zur Detektion von Mikroorganismen erforscht.

Die gegenwärtigen analytischen Techniken, die zur Detektion von Mikroorganismen und Zellen genutzt werden, sind selten automatisiert, verwenden unveränderlich visuelle und/oder chemische Methoden, um den Stamm oder eine Untergattung zu identifizieren, und es handelt sich um inhärent langsame Verfahren. Es gibt ein Bedürfnis nach praktischen und nach schnellen Systemen für klinische Analysen bzw. Untersuchungen. Es gibt insbesondere ein wachsendes Bedürfnis nach standardisierten Verfahren zur Analyse von Samen, die in der Lage sind, verlässlich und schnell Ergebnisse zu liefern, und die bei der Beurteilung der männlichen Unfruchtbarkeit bzw. Infertilität und für eine Reihe anderer Anwendungen einschließlich der In-vitro-Fertilisation (IVF), künstlicher Insemination durch Spendersamen (AID) und der forensischen Medizin bzw. Gerichtsmedizin verwendet werden können. Die Weltgesundheitsorganisation bzw. World Health Organization, WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, Cambridge University Press, Cambridge, U.K. (1987). Die Beurteilung einer männlichen Unfruchtbarkeit durch die Analyse von Samen schließt eine Reihe von Tests mit ein einschließlich der Beurteilung der Spermien-Anzahl, Beweglichkeit, Morphologie, Hormon-Pegel, Sperma-Antikörper, Sperma-Zervikalschleim-Wechselwirkung und Sperma-Biochemie. Wang et al., American Association for Clinical Chemistry, Endo. 10: 9-15 (1992). Es gibt ein Bedürfnis nach Systemen, die in der Lage sind, eine Reihe von schnellen und verlässlichen Analysen mit einer Spermaprobe durchzuführen.

Ein Ziel der Erfindung ist es, analytische Systeme bereitzustellen, die Mikrovolumina einer Spermaprobe analysieren können und analytische Ergebnisse schnell erzeugen. Ein anderes Ziel ist es, leicht massenhergestellte, wegwerfbare und kleine (z.B. weniger als 1 cm<sup>3</sup> Volumen) Bauelemente bzw. Vorrichtungen bereitzustellen, die mesoskalisch-funktionelle Elemente aufweisen, die zu schnellen automatisierten Analysen von Sperma in einer Reihe von Anwendungen in der Lage sind. Es ist ein weiteres Ziel der Erfindung, eine Familie von derartigen Vorrichtungen bzw. Bauelementen bereitzustellen, die individuell verwendet werden können, um eine Reihe von schnellen Tests, z.B. Tests betreffend die Sperma-Beweglichkeit und die Morphologie zu implementieren. Ein anderes Ziel ist es, eine Familie von Vorrichtungen bzw. Bauelementen zur Durchführung einer In-vitro-Fertilisation in einem Bauelement durchzuführen, indem Mikrovolumina der Probe verwendet werden.

#### Zusammenfassung der Erfindung

Die Erfindung liefert Verfahren und ein Apparat zur Handhabung von Sperma. Die Vorrichtung kann in einer Reihe von Anwendungen einschließlich des Testens der Sperma-Mobilität und der Morphologie und der In-vitro-Fertilisation verwendet werden. Bei einer Ausführungsform stellt die Erfindung eine Vorrichtung bereit, die ein Festkörper-Substrat aufweist, das typischerweise in der Größenordnung von wenigen Millimetern Dicke ist und ungefähr 0,2 bis 2,0 cm<sup>2</sup> aufweist und mikrofabriziert ist, um eine Proben-Einlaßöffnung und ein mesoskalisches Kanalsystem festzulegen. Bei einer Ausführungsform kann das Bauelement bzw. die Vorrichtung für eine In-vitro-Fertilisation verwendet werden. Bei dieser Ausführungsform ist das Substrat der Vorrichtung mikrofabriziert, und zwar mit einer Sperma-Einlaßöffnung, einer Eieinniskammer und einem länglichen mesoskalischen Kanal, der eine Verbindung zwischen der Eieinniskammer und der Einlaßöffnung darstellt und der eine kompetitive Wanderung von Sperma von der Einlaßöffnung durch den Kanal zu der Eieinniskammer erlaubt, wo die Fertilisation auftritt. Bei einer anderen Ausführungsform kann das Substrat eine Spermaeinlaßöffnung und einen mesoska-

lischen Kanal aufweisen, der sich von der Einlaßöffnung aus erstreckt. Bei dieser Ausführungsform kann Sperma an die Einlaßöffnung angebracht werden und das Ausmaß der Wanderung des Spermazellen durch den Kanal kann als ein Indikator für die Sperma-Mobilität oder Morphologie dienen. Der Ausdruck "mesoskalisch" wird hierin verwendet, um Fließ-Durchgänge festzulegen, die Querschnittsabmessungen der Größenordnung von ungefähr 0,1  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$  aufweisen, wobei die bevorzugten Breiten in der Größenordnung von 2,0 bis 300  $\mu\text{m}$  und noch bevorzugter bei 3 bis 100  $\mu\text{m}$  liegen. Für viele Anwendungen können Kanäle von 5 - 50  $\mu\text{m}$  Breite nützlich sein. Die Kammern in den Substraten werden häufig größere Abmessungen aufweisen, zum Beispiel wenige Millimeter. Bevorzugte Tiefen der Kanäle und Kammern liegen in der Größenordnung von 0,1 bis 100  $\mu\text{m}$ , typischerweise von 2 - 50  $\mu\text{m}$ .

Bei einer Ausführungsform kann der mesoskalische Kanal der Vorrichtung einen fraktalen Bereich aufweisen, der Gabelungen bzw. Abzweigungen aufweist, die zu mehreren Sekundärkanälen führen, um die Detektion oder kompetitive Wanderung der Spermaprobe zu verbessern bzw. zu erhöhen. Der fraktale Bereich kann eine gleiche Anzahl von Abzweigungen und Verbindungen aufweisen, die in Reihe entlang der Richtung der Spermawanderung angeordnet sind. Bei einer Ausführungsform nehmen die sich verzweigenden Kanäle in dem fraktalen Bereich progressiv in der Querschnittsfläche bei jeder Gabelung bzw. Abzweigung ab und erhöhen sich bei jeder Verbindung. Die Verwendung eines mesoskalischen fraktalen Fließ-Kanal ist in USSN 07/877,701 offenbart, das am 1. Mai 1992 eingereicht wurde (entspricht PCT WO 93/22054, veröffentlicht am 11. November 1993). Die Vorrichtungen und Verfahren dieser Erfindung können verwendet werden, um eine Mannigfaltigkeit von automatisierten sensitiven und schnellen Schadstoff-freien Tests einschließlich klinischer Analysen von Sperma-Eigenschaften zu implementieren, und zur schnellen In-vitro-Fertilisation.

Im allgemeinen, wie hierin offenbart, umfaßt das Festkörper-Substrat einen Chip bzw. ein Substrat, der den mesoskalischen Kanal enthält und andere Funktions-Elemente.

Die Kanäle und Elemente können aus Silizium und anderen Festkörper-Substraten gestaltet und mikrofabriziert werden, indem etablierte Mikroherstellungs- bzw. Mikrobearbeitungs-Verfahren verwendet werden. Die Kammern und Kanäle in den Vorrichtungen können auf der Oberfläche des Substrats mikrofabriziert werden und dann kann eine Abdeckung, zum Beispiel eine transparente Glas-Abdeckung haftend angebracht werden, zum Beispiel anodisch über der Oberfläche kontaktiert bzw. gebondet werden. Die Bauelemente sind typischerweise auf einer Skala gestaltet, die geeignet ist, um Mikrovolumina ( $< 10 \mu\text{L}$ ) einer Probe zu analysieren, die in das Fließsystem durch eine Einlaßöffnung eingeführt werden, die zum Beispiel durch ein Loch, das mit dem Fließ-System durch das Substrat oder durch ein Deckglas hindurch in Verbindung steht, festgelegt ist. Das Volumen der mesoskalischen Kanäle und Kammern wird typischerweise  $< 5 \mu\text{L}$  betragen und das Volumen der individuellen Kanäle, Kammern oder anderer Funktions-Elemente wird häufig weniger als  $1 \mu\text{L}$  betragen, zum Beispiel in dem Nanoliter- oder sogar Picoliter-Bereich liegen. Analysen bzw. Untersuchungen können schnell durchgeführt werden und nachdem ein Assay bzw. eine Untersuchung vollendet ist, kann die Vorrichtung weggeworfen werden.

Die Chips können mit einer Anwendungseinrichtung verwendet werden, die einen Aufnahme-Sitz zum Halten des Chips enthält und die mit einer oder mehreren Eingangsöffnungen auf dem Chip mit einer oder mehreren Fließ-Leitungen in der Anwendungseinrichtung zusammenpaßt. Bevor oder nachdem eine Sperma-Probe auf die Einlaßöffnung des Substrats angebracht bzw. angewendet wird, kann der Chip in der Anwendungseinrichtung platziert werden und eine Pumpe kann zum Beispiel in der Anwendungseinrichtung getätigten werden, um einen Puffer oder ein anderes Fluid einzuführen, um die Kanäle und Kammern hydrodynamisch bzw. hydraulisch zu füllen oder um die Sperma-Probe oder andere Fluid-Bestandteile in das Fließ-System (oder heraus) zu zwingen. Alternativ kann Sperma in den Chip mittels der Anwendungseinrichtung eingespritzt werden. Eine Sperma-Probe oder andere Fluid-Bestandteile können ebenso in das Kanalsystem einfach mittels der kapillaren Wirkung durch eine

Einlaßöffnung eintreten.

Die Fluid-Inhalte der Kanäle und Kammern der Bauelemente bzw. Vorrichtungen können optisch beobachtet werden, und zwar entweder visuell oder mittels einer Maschine durch ein lichtdurchlässiges Fenster, wie zum Beispiel eine transparente Abdeckung über dem Kanalsystem, oder durch einen lichtdurchlässigen Abschnitt des Substrates selbst. Somit erlauben die Bauelemente bzw. Vorrichtungen den optischen Nachweis, zum Beispiel von Sperma-Wanderung in einem Kanal oder in einer anderen Ausführungsform die Ei-Fertilisation in einer Eieinnistkammer. Die Anwendungseinrichtung kann eine Einrichtung umfassen, um die Inhalte des Bauelements bzw. der Vorrichtung zu sehen, wie zum Beispiel ein optisches Beobachtungs-System, wie zum Beispiel ein Mikroskop oder eine Kamera.

Bei einer anderen Ausführungsform kann das Substrat der Vorrichtung bzw. des Bauelements eine Spermaeinlaßöffnung, einen mesoskalischen Kanal, der sich von der Einlaßöffnung aus erstreckt und eine mesoskalische Detektionskammer, die sich in Fluid-Verbindung mit dem Fließ-Kanal befindet, einschließen. Die mesoskalische Detektionskammer ist mit einem bindenden Anteil bzw. einer bindenden Hälfte versehen, die in der Lage ist, feststellbar einen Sperma-Antikörper oder ein Hormon zu binden, um die Detektion eines bestimmten Sperma-Bestandteils zu ermöglichen.

Die Verwendung eines Detektions-Bereichs erlaubt es, daß eine Reihe von Bindungs-Analysen bzw. Bindungs-Untersuchungen mit einer Sperma-Probe durchgeführt werden. Die Verwendung einer mesoskalischen Detektionskammer ist in USSN 07/877,702 offenbart, die am 1. Mai 1992 eingereicht wurde (entspricht PCT WO 93/22053, veröffentlicht am 11. November 1993).

Einige der Merkmale und Vorteile der Bauelemente bzw. Vorrichtungen, die in Übereinstimmung mit den hierin offenbarten Lehren gebaut sind, werden in Tabelle 1 zusammengefaßt. Eine Vorrichtung kann zwei oder mehr getrennte Systeme

beinhalten, die zum Beispiel durch eine gemeinsame Einlaßöffnung gespeist werden, um eine Vielzahl von Analysen bzw. Untersuchungen zu implementieren. Die Vorrichtung bzw. das Bauelement kann ebenso ein Steuersystem aufweisen, so daß Daten aus dem Probenbereich und dem Steuerbereich detektiert und verglichen werden können. Die Vorrichtungen bzw. die Bauelemente können verwendet werden, um eine Reihe von schnellen klinischen Tests zur Analyse einer Spermaprobe zu implementieren. Die Vorrichtungen bzw. Bauelemente können zum Beispiel zur Detektion der Mobilität oder Morphologie einer Sperma-Probe genutzt werden, oder um die Gegenwart von Sperma-Antikörpern oder Hormonen zu testen oder um die Wechselwirkung von Sperma mit Zervikalschleim zu testen, oder für andere Analysen bzw. Untersuchungen, die beim Testen bzw. Prüfen der Unfruchtbarkeit verwendet werden. Zusätzlich können die Vorrichtungen bzw. Bauelemente verwendet werden, um die Wechselwirkung einer Sperma-Probe mit anderen Reagenzien, wie zum Beispiel Spermiziden zu prüfen. Die Erfindung stellt Verfahren und Vorrichtungen bzw. Bauelemente zur Verwendung in einem breiten Bereich möglicher Untersuchungen bzw. Analysen bereit. Die Untersuchungen können schnell vollendet werden und beim Abschluß der Untersuchung kann der Chip weggeworfen bzw. entsorgt werden, was vorteilhafterweise eine Kontamination zwischen den Proben verhindert, potentiell biologisch gefährliches Material beseitigt und eine billige Mikroproben-Analyse bereitstellt.

**Tabelle 1**

Merkmal	Vorteil
Flexibilität	Keine Grenzen bezüglich der Anzahl von verfügbaren Chip-Gestaltungen oder Anwendungen.
Reproduzierbarkeit	Erlaubt verlässliche, standardisierte Massenproduktion von Chips.

Niedrige Produktionskosten	Erlaubt eine auf Wettbewerb gerichtete Preisgestaltung mit bestehenden Systemen. Wegwerfnatur für Einzelanwendungs-Verfahren.
Kleine Größe	Es ist keine globige Instrumentierung erforderlich. Führt eigenständig zu tragbaren Einheiten und Systemen, die zur Verwendung in nicht-herkömmlichen Laborumgebungen gestaltet sind. Minimale Lager- und Versandkosten.
Mikroskalisch	Minimale Proben- und Reagenz-Volumina sind erforderlich. Verringert Reagenz-Kosten, insbesondere für teurere, spezialisierte Testverfahren. Erlaubt eine vereinfachte Meßgeräteausstattung bzw. ein vereinfachtes Meßprogramm.
Sterilität	Chips können zur Verwendung bei mikrobiologischen Untersuchungen oder anderen Verfahren, die eine saubere Umgebung erfordern, sterilisiert werden.
Abgeschlossenes bzw. abgedichtetes System	Minimale Biorisiken. Gewährleistet Verfahrens-Integrität.
Mehrere Schaltungs-Fähigkeiten bzw. Möglichkeiten	Kann mehrere Verfahren oder Analysen auf einem einzigen Chip durchführen. Erlaubt Felduntersuchungen.
Mehrfach-Detektorfähigkeiten	Weitet die Fähigkeiten zur Untersuchung und Verfahrensüberwachung auf nahezu jegliches System aus. Erlaubt einen breiten Bereich an Anwendungen.
Wiederverwendbare Chips	Verringert die Prozeßkosten für den Nutzer für bestimmte Anwendungen.

### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Figur 1 ist eine vergrößerte Draufsichtansicht der Vorrichtung 10 bzw. des Bauelements 10 gemäß der Erfindung, die bzw. das ein Substrat 14, das mit Öffnungen 16 mikrofertigt ist, einen mesoskalischen Fließ-Kanal 20 und ein fraktal gegabeltes System von Fließkanälen 40 umfaßt.

Figur 2 ist eine Längs-Querschnittsansicht der Vorrichtung, die in Figur 1 gezeigt ist.

Figur 3 ist eine perspektivische Ansicht der Vorrichtung der Figur 1.

Figur 4 ist eine schematische Querschnittsansicht eines analytischen Baulements 10, das in einer Anwendungseinrichtung 50 aufgenommen wird, die verwendet wird, um das Bauelement 10 zu halten und um Proben-Fluide zu und aus dem Bauelement 10 zu liefern und zu empfangen.

Figur 5 ist eine schematische Draufsicht eines Substrats 14, das mit einem fraktalen gegabelten System von Fließkanälen 40 mikrofertigt ist, die symmetrisch auf dem Substrat angeordnet sind und die sich zu einem engeren Durchmesser in Richtung auf die Mitte des fraktalen Systems verjüngen.

Figur 6 ist eine schematische Draufsicht des Bauelements 10, das ein Substrat 14 enthält, das mit einem fraktal gegabelten System von Fließkanälen 40 mikrofertigt ist und das mit Kügelchen bzw. Rippen 42 versehen ist, um die Fließ-Beschränkung und Agglomeration in dem Fraktal erhöht.

Figur 7 ist eine vergrößerte Draufsicht eines Bauelements 10, das eine Spermakammer 22C und eine Eiennistkammer 22D enthält, die mit dem fraktalen Fließ-System 40 verbunden sind.

Figur 8 ist eine Querschnitts-Perspektivansicht des Fließkanals 20 auf einem inerten Substrat 14 mit Vorstehungen 122, die sich von einer Wand des

Fließkanals erstrecken und die als eine Barriere gegen die Wanderung von Sperma dienen.

Figur 9 ist eine schematische Draufsicht eines Multitest-Apparats bzw. Multiprüf-Apparats, der in Übereinstimmung mit der Erfindung aufgebaut ist.

Figur 10 ist eine schematische Draufsicht eines analytischen Bauelements, das mit einem Paar von fraktal sich gabelnden Fließ-Kanälen 40 hergestellt ist.

Figur 11 ist eine schematische Perspektivansicht eines Apparats 60, der in Verbindung mit dem Bauelement 10 zum Sehen der Inhalte des Bauelements 10 verwendet wird.

Figur 12 ist eine schematische Querschnittsansicht des Apparats 60 der Figur 11.

Figuren 13, 14 und 15 zeigen Draufsichten von vergrößerten verschiedenen Ausführungsformen eines mesoskalischen Filters 24, der in einen Fließkanal 20 in einem analytischen Bauelement 10 mikrofabriziert ist.

Ähnliche Bezugszeichen in den jeweiligen Zeichnungen weisen auf entsprechende Teile hin.

#### Detaillierte Beschreibung

Die Erfindung betrifft Verfahren und ein Apparat zur Handhabung von Sperma, der in einer Reihe von Anwendungen einschließlich der Prüfung der Spermamobilität und Morphologie und der In-vitro-Fertilisation verwendet werden kann. Die Erfindung stellt eine Vorrichtung mit einem Festkörper-Substrat bereit, das typischerweise eine Dicke in der Größenordnung von wenigen Millimetern und ungefähr 0,2 bis 2 cm<sup>2</sup> aufweist und das mikrofabriziert ist, um eine Spermaeinlaßöffnung und ein mesoskalisches Fließ-System festzulegen, das sich von der Einlaßöffnung aus

erstreckt. Bei einer Ausführungsform wird eine Spermaprobe an die Einlaßöffnung angelegt und das Ausmaß der Migration der Spermen durch den Kanal kann als ein Hinweis zum Beispiel auf die Beweglichkeit oder Morphologie der Spermaprobe dienen. Bei einer anderen Ausführungsform kann das Substrat weiter eine Eieinnistkammer beinhalten und einen länglichen Kanal mit mesoskalischen Querschnittsabmessungen, der eine Verbindung zwischen der Eieinnistkammer und der Spermaeinlaßöffnung darstellt. Im Betrieb wird eine Spermaprobe an die Einlaßöffnung angelegt bzw. angebracht und das Sperma in der Probe wandert dann kompetitiv durch den Kanal zu der Eikammer, wo Fertilisation des Eis auftritt.

Analytische Vorrichtungen mit mesoskalischen Fließ-Systemen können in großen Mengen aus einem Festkörper-Substratmaterial gestaltet und hergestellt werden. Sie können leicht sterilisiert werden. Silizium ist ein bevorzugtes Substratmaterial, da die gut entwickelte Technologie seine präzise und effiziente Herstellung bzw. Fabrikation erlaubt, jedoch können andere Materialien einschließlich in Formen gegossene oder geformte Polymere, die Polytetrafluorethylene einschließen, verwendet werden. Der Probeneinlaß und andere Öffnungen, das mesoskalische Fließ-System einschließlich der Fließ-Kanäle bzw. des Fließ-Kanals und andere Funktions-Elemente können billig und in großen Mengen aus einem Silizium-Substrat durch irgendeine der Mannigfaltigkeit von Mikrobearbeitungs-Verfahren, die jenen Fachleuten bekannt sind, fabriziert bzw. hergestellt werden. Die verfügbaren Mikrobearbeitungs-Verfahren beinhalten Dünnschicht-Abscheidungsverfahren, wie zum Beispiel Spin-Beschichtung ("spin coating") und chemische Dampfabscheidung ("chemical vapor deposition" bzw. CVD), Laser-Herstellung oder photolithographische Techniken, wie zum Beispiel UV- oder Röntgenverfahren oder andere Ätz-Verfahren, die entweder durch naßchemische Prozesse oder Plasmaprozesse durchgeführt werden können. (Siehe zum Beispiel Manz et al., Trends in Analytical Chemistry, 10: 144-149 (1991)).

Fließkanäle mit variierenden Breiten und Tiefen können mit mesoskalischen Abmessungen zur Verwendung bei Analyse einer Spermaprobe hergestellt werden.

Das Siliziumsubstrat, das einen vorgefertigten mesoskalischen Fließ-Kanal beinhaltet, kann mit einer dünnen Glasabdeckung abgedeckt und abgedichtet, zum Beispiel anodisch gebondet bzw. gebunden sein. Andere klare oder lichtundurchlässige Abdeck-Materialien können verwendet werden. Alternativ können zwei Siliziumsubstrate in der Art eines Sandwiches angeordnet werden oder ein Siliziumsubstrat kann zwischen zwei Glasabdeckungen gesandwiched werden. Die Verwendung einer transparenten Abdeckung führt zu einem Fenster, das die dynamische Betrachtung der Kanalinhalt erleichtert und ein optisches Testen des mesoskalischen Fließ-Systems entweder visuell oder durch ein Gerät erlaubt. Andere Ansätze zur Herstellung können gemacht werden.

Die Kapazität der Bauelemente ist sehr gering und deshalb ist die Menge an Proben-Fluid, das für eine Analyse benötigt wird, gering. Zum Beispiel ist in einem 1 cm x 1 cm Siliziumsubstrat, das an seiner Oberfläche ein Feld mit 500 Rillen aufweist, die  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  tief x 1 cm ( $10^4 \mu\text{m}$ ) lang sind, das Volumen einer jeden Rille  $10^{-3} \mu\text{L}$  und das gesamte Volumen der 500 Rillen  $0,5 \mu\text{L}$ . Das geringe Volumen der mesoskalischen Fließ-Systeme erlaubt es, daß Untersuchungen bzw. Analysen mit sehr geringen Mengen einer Flüssigkeitsprobe ( $< 5 \mu\text{L}$ ) durchgeführt wird. Die mesoskalischen Bauelemente können mit Mikroliter-Volumen oder alternativ Nanoliter-Volumen oder weniger mikrofertigertigt werden, was vorteilhafterweise die Menge der Probe, des Puffers oder anderer Fluide, die für die Analyse benötigt werden, beschränkt. Somit ist eine wichtige Folge und ein wichtiger Vorteil der Verwendung von Fließ-Kanälen mit mesoskalischen Abmessungen, daß Analysen auf einem sehr kleinen Maßstab durchgeführt werden können.

Bei einer Ausführungsform, die schematisch in Figuren 1, 2 und 3 gezeigt ist, kann das Bauelement 10 verwendet werden, um zum Beispiel die Beweglichkeit oder Morphologie einer Sperma-Probe schnell zu untersuchen. Das Bauelement 10 beinhaltet ein Siliziumsubstrat 14, das mit Öffnungen 16, einem primären Proben-Kanal 20A und einem fraktalen System von Kanälen 40 mikrofertigertigt ist. Die

Öffnungen können mit mesoskalischen oder größeren Abmessungen mikrofertigt sein. Der fraktale Bereich 40 umfaßt in diesem Fall eine gleiche Anzahl von Gabelungen und Verbindungen, die in Reihe durch den fraktalen Bereich angeordnet sind, was zu einem dritten Kanal 20B führt. Das Substrat 14 ist mit einem klaren Glas- oder Plastikfenster 12 abgedeckt, um eine einschließende Wand des Kanals auszubilden. Im Betrieb, nachdem alle Kanäle hydraulisch bzw. hydrodynamisch mit einem geeigneten Flüssigkeits-Medium, zum Beispiel Zervikalschleim oder einem Puffer gefüllt sind, wird eine Sperma-Probe an eine Einlaßöffnung 16A angelegt bzw. angebracht. Das Sperma in der Probe wandert in den Fließ-Kanal 20A und dann durch den fraktalen Bereich 40 in Richtung auf den Kanal 20B und die Öffnung 16B. Das Ausmaß des Fortschreitens einer Sperma-Probe durch den fraktalen Pfad 40 kann als ein Hinweis bzw. ein Indikator für die Sperma-Beweglichkeit und Morphologie dienen. Das Fließen einer Sperma-Probe kann optisch, zum Beispiel mit einem Mikroskop entweder visuell oder durch ein Gerät durch die transparente Abdeckung über dem Fließ-System oder durch einen transparenten Bereich des Substrats selbst festgestellt bzw. detektiert werden.

Bei einer anderen Ausführungsform kann das fraktale System 40 auf einem Siliziumsubstrat mit verringerten Dimensionen bei jeder Gabelung mikrofertigt werden, was aufeinanderfolgend engere Fließ-Kanäle bereitstellt, wie schematisch in Figur 5 gezeigt. Figur 5 zeigt ein Bauelement 10, das ein Substrat 14 umfaßt, das mit fraktalen Fließ-Kanälen 40 mikrofertigt ist, die eine verringerte Querschnittsfläche relativ zu dem primären Fließ-Kanal 20A und dem dritten Fließ-Kanal 20B aufweisen. Im Betrieb tritt Sperma in einer Probe in das Bauelement 10 durch eine Einlaßöffnung 16A und einen Kanal 20A ein und wandert durch den fraktalen Bereich 40 in Richtung auf den Kanal 20B und die Öffnung 16B. Der fraktale Bereich 40 liefert ein ausgedehntes Netzwerk, das für die kompetitive Wanderung einer Sperma-Probe geeignet ist. Das fraktale System kann mit einer komplexeren Reihe von Gabelungen bzw. Abzweigungen, wie schematisch bei dem Bauelement 10 in Figur 10 gezeigt, mikrofertigt werden, das ein Paar von sich fraktal gabelnden Kanälen 40A und 40B

beinhaltet. Das fraktale Kanal-Netzwerk 40A ist in Richtung auf die Mitte des Fraktals mit aufeinanderfolgend engeren Kanälen aufgebaut, wodurch die Empfindlichkeit gegenüber der Sperma-Wanderung erhöht wird.

Die analytischen Bauelemente, die das mesoskalische Kanalsystem beinhalten, können in Verbindung mit einer Anwendungseinrichtung zum Liefern und Empfangen von Fluiden zu und aus den Bauelementen verwendet werden, zum Beispiel mit der Anwendungseinrichtung 50, die schematisch in Figur 4 gezeigt ist, die einen Aufnahme-Sitz 58 zum Halten des Bauelements 10 und zum Anpassen bzw. Ausrichten der Öffnungen (zum Beispiel der Öffnungen 16 auf dem Bauelement 10) mit einer Fließ-Leitung 56 in der Anwendungseinrichtung umfaßt. Die Anwendungseinrichtung beinhaltet eine Pumpe 52, die verwendet werden kann, um Proben-Fluide in das Bauelement 10 einzuspritzen oder davon aufzunehmen. Alternativ kann die Probe in das Bauelement eingespritzt werden oder in das Fließ-System einfach durch Kapillarwirkung eintreten. Vorrichtungen wie zum Beispiel Ventile oder andere mechanische Sensoren zum Nachweis eines Proben-Fluids in den Bauelementen können direkt auf dem Siliziumsubstrat hergestellt werden und können in Massen gemäß gut ausgereiften Technologien hergestellt werden. Angell et al, Scientific American, 248: 44-55 (1983). Alternativ können Sensoren, wie zum Beispiel optische Detektoren und andere Detektionseinrichtungen bzw. Nachweiseinrichtungen in der Anwendungseinrichtung vorgesehen werden, die in Verbindung mit dem Bauelement verwendet wird.

Bei einer Ausführungsform können die analytischen Bauelemente ebenso in Verbindung mit einer Anwendungseinrichtung zum Betrachten der Inhalte der Bauelemente verwendet werden. Bei einer anderen Ausführungsform kann eine Kamera in die Anwendungseinrichtung mit eingeschlossen werden, wie in der Anwendungseinrichtung 60 gezeigt ist, die schematisch in den Figuren 11 und 12 gezeigt ist. Die Anwendungseinrichtung 60 ist mit einem Gehäuse 62, einen Betrachtungs-Bildschirm 64 und einen Schlitz 66, um einen Chip in die Anwendungs-

einrichtung einzuführen, versehen. Wie im Querschnitt in Figur 12 gezeigt ist, kann die Anwendungseinrichtung 60 ebenso eine Videokamera 68, ein optisches System 70 und einen Neigungs-Mechanismus 72 zum Halten eines Bauelements 10, die es erlaubt, die Plazierung und den Winkel des Bauelements 10 manuell einzustellen, beinhalten. Das optische System 70 kann ein Linsensystem zum Vergrößern der Kanal-Inhalte sowie eine Lichtquelle aufweisen. Die Videokamera 68 und der Bildschirm 64 ermöglichen es, daß Proben-Fluide visuell überwacht werden und optional aufgezeichnet werden, indem die Anwendungseinrichtung verwendet wird.

Bei einer anderen Ausführungsform kann das Substrat zum Beispiel in einer Anwendungseinrichtung bei einem Winkel bezüglich einer horizontalen Ebene angeordnet sein, um eine Neigung für die Wanderung einer Spermaprobe bereitzustellen, um weiter die Detektion der Mobilität zu erhöhen. Bei einer anderen Ausführungsform kann der Sperma-Fließkanal Vorstehungen 122 aufweisen, die in Figur 8 gezeigt sind, um eine Barriere für die kompetitive Wanderung von Sperma bereitzustellen.

Die Bauelemente können mit einem mesoskalischen Fließ-Kanal mikrofabriziert werden, der einen Detektions-Bereich beinhaltet, um einen Bestandteil einer Sperma-Probe, wie zum Beispiel Sperma-Antikörper oder Hormone zu detektieren. Der Detektions-Bereich kann einen bindenden Anteil bzw. eine bindende Hälfte aufweisen, die in der Lage ist, einen vorbestimmten Bestandteil der Spermaprobe zu binden. Der Bindungs-Anteil, wie zum Beispiel ein Antigen bindendes Protein, kann an der Oberfläche der Fließ-Kanäle oder auf einem Festphasen-Reaktanden, wie zum Beispiel einer Kugel bzw. Perle bzw. Rippe festgesetzt bzw. unbeweglich gemacht. Der bindende Anteil in dem Detektions-Bereich kann in Lösung in den Detektions-Bereich eingeführt werden oder alternativ auf der Oberfläche der mesoskalischen Fließ-Kanäle zum Beispiel durch physikalische Absorption auf den Kanal-Oberflächen oder durch chemische Aktivierung der Oberfläche und nachfolgenden Haften bzw. Anlagern von Biomolekülen an der aktivierte Oberfläche festgesetzt werden. Die in der Fachwelt

verfügbareren Techniken können zur chemischen Aktivierung von siliziumdioxidhaltigen bzw. "silaceous" Kanaloberflächen und zum nachfolgenden Anbringen eines bindenden Anteils an die Oberflächen verwendet werden. (Siehe zum Beispiel Haller in: Solid Phase Biochemistry, W.H. Scouten, Ed., John Wiley, New York, Seiten 535-597 (1983); und Mandenius et al., Anal. Biochem., 137: 106-114 (1984) und Anal. Biochem., 170: 68-72 (1988)). Die Verwendung eines bindenden Anteils für Untersuchungen bei einer mesoskalischen Detektionskammer sowie Techniken, um den bindenden Anteil in der Detektionskammer bereitzustellen, sind in der parallel anhängigen zu dieser in Beziehung stehenden Anmeldung offenbart, USSN 07/877,702, eingereicht am 1. Mai 1992 (entspricht PCT WO 93/22053, veröffentlicht am 11. November 1993). Die Detektionskammer kann in einer Reihe von Bindungs-Untersuchungen verwendet werden, zum Beispiel um die Wechselwirkung einer Sperma-Probe mit Zervikalschleim zu untersuchen, um die Wirksamkeit von Spermiziden zu prüfen, um die Gegenwart von Antikörpern oder Schadstoffen in der Probe zu untersuchen oder Sperma-Zählungen durchzuführen.

Bei einer Ausführungsform kann der bindende Anteil auf einem Partikel bzw. Teilchen festgesetzt werden, das in der Lage ist, eine detektierbare Agglomeration eines Bestandteils einer Sperma-Probe in einem fraktalen mesoskalischen Fließ-System zu induzieren. Wie bei dem Bauelement 10 gezeigt, das schematisch in der Figur 6 gezeigt ist, können Teilchen bzw. Partikel 42, die mit einem bindenden Protein überzogen sind, das spezifisch für eine gegebene Analyse in der Sperma-Probe ist, in dem fraktalen Bereich 40 vorgesehen seien, um eine analytisch-induzierte Agglomeration eines Fluids in dem fraktalen Bereich zu fördern. Die Agglomeration in dem fraktalen Bereich kann optisch durch ein Fenster, das zum Beispiel über dem fraktalen Bereich angeordnet ist oder zum Beispiel durch die Feststellung von Druck- oder Leitfähigkeitsänderungen des Proben-Fluids detektiert werden.

Bei einer anderen Ausführungsform können die Bauelemente der Erfindung verwendet werden, um eine In-vitro-Fertilisation durchzuführen. Eine Ausführungsform eines In-

vitro-Fertilisations-Bauelements ist in Figur 7 gezeigt. Das Bauelement 10 in Figur 7 beinhaltet eine Sperma-Kammer 22C und eine Eieinniskammer 22D, die durch ein mesoskalisches fraktales Kanalsystem 40 verbunden sind. Das Bauelement beinhaltet eine klare bzw. transparente Abdeckung 12, die über dem fraktalen Bereich und teilweise quer über das obere Ende der Kammern 22C und 22D angeordnet ist, wobei eine offene Öffnung an den oberen Enden der Kammern belassen wird. Alternativ kann sich die Abdeckung 12 über die Gesamtheit der Oberfläche erstrecken (nicht gezeigt) und Löcher festlegen, die über der Kammer 22C und 22D angeordnet sind, die ein Einführen von Sperma und Ei erlaubt, aber eine Evaporation be- bzw. verhindern. Im Betrieb wird eine Sperma-Probe an die Kammer 22C angelegt, zum Beispiel durch das obere Ende der Kammer. Ein Ei wird in der aufnehmenden Kammer bzw. Nist-Kammer 22D plaziert. Das Fließ-System, das die Kammern 22C und 22D, die Kanäle 20 und den fraktalen Bereich 40 beinhaltet, ist mit einem Puffer vorgesehen, der zum Beispiel ein Säugetier-Tubarfluid beinhaltet. Das Fließ-System kann ebenso die Pufferkammern 22B und 22A beinhalten, die in Fluid-Verbindung mit dem Fließ-System sind und die mit einem Puffer gefüllt sind, um die potentiell zerstörerischen Wirkungen von Fluid-Verlust durch Evaporation oder Dehydration aus dem Inneren des Substrats zu lindern. Kompetitive Wanderung der Sperma-Probe aus der Kammer 22C tritt durch den fraktalen Bereich 40 hindurch bis zu der Eieinniskammer 22D hin auf, wo die Fertilisation des Eies auftritt. Die Fertilisation bzw. Befruchtung kann zum Beispiel optisch entweder visuell oder durch eine Maschine bestimmt werden, indem die frühen Stadien einer Ei-Zellteilung beobachtet werden. Das Bauelement kann in Verbindung mit einer Anwendungseinrichtung verwendet werden, die an Öffnungen in dem Bauelement für die Zugabe oder Entnahme von Fluid-Bestandteilen aus dem Bauelement angepaßt ist. Die Anwendungseinrichtung kann zum Beispiel eine Einrichtung, wie zum Beispiel eine Pumpe oder eine Spritze zum hydrodynamischen bzw. hydraulischen Ausstoßen eines befruchteten Eies aus dem Bauelement nach der Fertilisation zum Beispiel direkt in einen Wirt-Uterus, indem zum Beispiel eine Salzlösung oder eine andere Flüssigkeit durch die Kanäle getrieben wird, beinhalten.

Das mesoskalische Kanal-System kann mit einem Filter zum Filtern von Sperma-Proben-Bestandteilen mikrofertigiert werden. Der Filter kann in dem Fließ-System zwischen der Sperma-Einlaßöffnung und dem Eiennistbereich mikrofertigiert werden, um die Filterung der Probe zu ermöglichen. Filter, die in dem Fließ-System mikrofertigiert werden können, beinhalten die Filter 24, die in Figuren 13, 14 und 15 gezeigt sind. Bei dem Bauelement 10 sind die Filter 24 zwischen den Fließ-Kanälen 20A und 20B mikrofertigiert, was es dem Proben-Fluid im Kanal 20A ermöglicht, durch den Filter 24 hindurchzugehen. Das Filtrat tritt durch den Filter 24 in den Kanal 20B aus. Der Filter 24 umfaßt mesoskalische Fließ-Kanäle mit im Vergleich zu den Kanälen 20A - 20B verringerten Durchmessern, die mit Tiefen und Breiten in der Größenordnung von 0,1 bis 20  $\mu\text{m}$  mikrofertigiert sind. Im Gegensatz dazu weisen die Fließ-Kanäle 20A und 20B Breiten in der Größenordnung von maximal ungefähr 500  $\mu\text{m}$  und typischer 100  $\mu\text{m}$  auf. Andere Filtereinrichtungen können verwendet werden, wie zum Beispiel die Pfosten 122, die sich von einer Wand des Fließ-Kanals 20, der in Figur 8 gezeigt ist, erstrecken.

Die Bauelemente können verwendet werden, um eine Mannigfaltigkeit von automatisierten, sensitiven und schnellen klinischen Analysen einer Sperma-Probe zu implementieren. Die Bauelemente können bei einer Reihe von Anwendungen einschließlich Fruchtbarkeitstest einer Sperma-Probe, Tests von Sperma-Bindungs-Eigenschaften, In-vitro-Fertilisation und gerichtsmedizinischen Analysen bzw. forensischen Analysen verwendet werden. Um die Genauigkeit einer Untersuchung zu erhöhen, kann das Substrat mit dem Zweck hergestellt werden, einen Kontrollbereich in dem Fließ-System zu beinhalten, zum Beispiel einen Bereich, der bezüglich seiner Geometrie identisch mit dem Testbereich ist, der jedoch keine bindenden Anteile enthält. Ein Proben-Fluid wird sowohl durch den analytischen als auch durch den Kontroll-Bereich durchgeführt, um den Vergleich der Bereiche zu ermöglichen. Die Bauelemente können ebenso eine Vielzahl von mesoskalischen Fließ-Systemen aufweisen, um eine Vielzahl von Untersuchungen zu ermöglichen, die an einer Sperma-Probe durchgeführt werden sollen. Nach Abschluß der Untersuchung werden

die Bauelemente typischerweise entsorgt bzw. weggeworfen. Die Verwendung von Einweg-Bauelementen schließt eine Kontamination bzw. Verunreinigung unter den Proben aus. Die Probe kann zu jeder Zeit eingeschlossen bleiben und das geringe Volumen vereinfacht die Abfallentsorgung.

Die Erfindung wird weiter aus den folgenden nicht beschränkenden Beispielen verstanden werden.

#### Beispiel 1

Die Sperma-Mobilität wird in dem Chip 10 geprüft, der schematisch in Figur 5 gezeigt ist. Eine Probe von Samen ( $< 2 \mu\text{L}$ ) wird auf einem Glas-Objektträger platziert und der Chip 10 wird oben auf die Samen-Probe derartig platziert, daß die Öffnung 16A auf der Samen-Probe positioniert ist. Das Vordringen einzelner Spermatozoen bzw. Samenzellen in die Öffnung 16A durch den Kanal 20A und dem fraktalen Bereich 40 wird überwacht, indem ein Mikroskop verwendet wird. Die experimentellen Ergebnisse können mit den Ergebnissen verglichen werden, die zuvor für eine gesunde Sperma-Probe erhalten bzw. aufgestellt wurden, um ein Test für die Sperma-Mobilität zu liefern.

#### Beispiel 2

Ein Kanal, der eine Barriere 122 mit 7  $\mu\text{m}$ -Spalten enthält (im Querschnitt in der Figur 8 gezeigt), wird mit einem HTF-BSA-Medium und einer Samen-Probe gefüllt, die an das Eingangloch angelegt wird. Das Fortschreiten bzw. Vordringen des Spermias durch die Barriere dient als ein Indikator für die Sperma-Mobilität.

#### Beispiel 3

Spermafunktionen werden auf dem mikrofertigisierten Festkörpersubstrat 14 getestet,

das in Figur 9 gezeigt ist. Eine Sperma-Probe wird an der Einlaßöffnung 16A zugegeben und fließt dann durch den mesoskalischen Fließ-Kanal 20 zu der Detektions-Kammer 40A, 40B und 40C. Eine fraktale Detektionskammer 40A liefert einen Test für Leukozyten und weist festgesetzte Antikörper zur herkömmlichen Leukozyten-Antigenen auf. Eine fraktale Detektionskammer 40B stellt einen Test für Sperma-Antikörper bereit und beinhaltet festgesetzte Antikörper zum menschlichen IgG, IgA oder IgM. Eine fraktale Detektionskammer 40C liefert einen Test für eine Akrosom-Reaktion und beinhaltet Lektine, die mit Fluoreszein markiert sind. Eine Fließbehinderung aufgrund von Agglutination in den Kammern kann zum Beispiel durch eine optische Detektion durch eine Glasabdeckung, die über dem Substrat angeordnet ist, festgestellt werden. Nachdem die Untersuchung vollendet ist, wird das Bauelement weggeworfen.

#### Beispiel 4

Ein Chip des Typs, der in Figur 7 gezeigt ist, und der eine Eieinnistkammer und eine Spermaeinlaßöffnung festlegt, die durch einen mesoskalischen Kanal verbunden sind, wurde mit ultrareinem Wasser gewaschen und dann mit HTF-BSA gefüllt. Eier und Samen werden von geeigneten Spendern gewonnen. Ein einziges Ei wurde zu der Eieinnistkammer übertragen, indem eine Mikropipette bzw. Zellpipette verwendet wurde und eine Probe an Samen wurde an die Spermaeinlaßöffnung angelegt, indem eine Mikropipette verwendet wurde. Das gesamte Verfahren wurde unter einer Laminarströmungs-Haube durchgeführt und die Anwendung bzw. das Anbringen des Eis und des Samens wurde visuell bestätigt, indem ein Mikroskop verwendet wurde. Das Fortschreiten (und die Selektion von Sperma) durch den Fließ-Kanal, der die Spermaeinlaßöffnung mit der Eieinnistkammer verbindet, die das Ei enthält, wurde visuell bestätigt. Der Chip wurde in einer feuchten Umgebung plaziert, um eine Evaporation aus dem Chip zu minimieren, danach wurde er bei 37 °C für einige Stunden im Brutkasten gehalten. Eine Fertilisation bzw. Befruchtung des Eis wurde durch eine visuelle Überprüfung bestätigt. Eine Implantation des befruchteten Eis

wurde erzielt, indem die gesamten Inhalte des Chips ausgetrieben werden. Zusätzlich enthält der Chip ein Reservoir bzw. einen Behälter von HTF-BSA in Verbindung mit den Kammern und einen Fließ-Kanal, um jegliche Evaporation bzw. Verdunstung aus dem Chip auszugleichen.

#### Beispiel 5

Experimente wurden in mesoskalischen Fließ-Kanälen durchgeführt, wobei die Sperma-Mobilität von menschlichen Samen-Proben überprüft wurden. Bei einem Test auf Sperma-Mobilität wurden Mikrokanäle (80  $\mu\text{m}$  breit, 20  $\mu\text{m}$  tief und 10 mm lang) in einem Glas-Siliziumchip mit menschlichem Tubar-Fluid (HTF bzw. "Human Tubal Fluid")-Medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) gefüllt, das 0,5 % BSA bzw. Benzolsufosäure (HTF-BSA) enthält. Eine Samen-Probe ( $2 < \mu\text{L}$ ) wurde auf einem Glas-Objektträger plaziert und der Chip wurde oben auf der Samen-Probe so plaziert, daß der Eingang für den Kanal auf der Samen-Probe positioniert war. Das Fortschreiten bzw. Vordringen einzelner Spermatozoen in den Kanal und entlang seiner Länge zu dem Ausgangs-Loch wurde überwacht, indem ein Mikroskop verwendet wurde, und aufgezeichnet, indem eine TV-Kamera und ein Videorecorder verwendet wurde. Es wurde Sperma beim Durchqueren der gesamten Länge des Kanals beobachtet und es konnte betrachtet werden, wie es sich beim Ausgangsloch ansammelt. Die Wanderung bzw. Migration von Sperma wurde ebenso in Kanälen mit einer Tiefe von 40, 100 und 120  $\mu\text{m}$  demonstriert.

Es wurde ebenso die Sperma-Mobilität in fraktalen Kanälen bestimmt, indem die Entfernung untersucht wurde, die das Sperma entlang des fraktalen Fließpfades wandert. Das obige Experiment wurde wiederholt, indem ein fraktaler Kanal (40  $\mu\text{m}$  breit, 20  $\mu\text{m}$  tief) verwendet wurde, der mit HTF-BSA-Medium gefüllt war. Es wurde beobachtet, wie Sperma durch den kurvenreichen fraktalen Pfadweg wandert (insgesamt neun rechtwinklige Kurven, zum Beispiel das Bauelement der Figur 11), und zwar vom Eingang bis zur Mitte des Kanals. Das Experiment wurde wiederholt,

indem ein fraktaler Kanal verwendet wurde, der 20  $\mu\text{m}$  tief war, der aber bezüglich der Breite bei jeder Gabelung verringert war (40, 30, 25, 20 und 10  $\mu\text{m}$ ) und dann in der Breite vergrößert wurde (20, 25, 30, 40  $\mu\text{m}$ ). Wieder wanderte Sperma zu der Mitte des fraktalen Kanals.

Die bi-direktionale Mobilität einer Sperma-Probe wurde also untersucht. Ein Kanal (60 und 80  $\mu\text{m}$  breit, 20  $\mu\text{m}$  tief) und fraktale Kanäle wurden mit HTF-BSA-Medium und Samen gefüllt, der gleichzeitig über die Löcher über jedem Ende des Kanals eingeführt wurde. Es wurde beobachtet, wie Sperma in Richtung auf die Mitte des Kanals (oder fraktalen Kanals) wandert und schließlich hindurchgelangt, während es in Richtung auf das Loch am entgegengesetzte Ende des Kanals wandert.

Ein Experiment mit geneigtem Kanal wurde ebenso mit einer Sperma-Probe durchgeführt. Ein Kanal (60  $\mu\text{m}$  breit, 20  $\mu\text{m}$  tief) wurde mit HTF-BSA-Medium gefüllt und eine Sperma-Probe an das Einlaßloch angelegt bzw. angebracht. Die Einlaß- und Auslaßlöcher wurden mit einem haftenden Band bzw. Klebeband abgedichtet. Der Chip wurde um 45° für verschiedene Zeidauern geneigt und dann wurde das Vordringen des Spermias den Kanal hinauf visuell bestimmt. Es wurde gefunden, daß Sperma effizient bzw. leistungsfähig dem geneigten Kanal hinauf wandert, und es konnte am Ausgangs-Loch am oberen Ende des Kanals beobachtet werden.

#### Beispiel 6

Ein Experiment, das verschiedene Spermizide überprüft, indem ein mesoskalisches Fließ-System verwendet wird, wurde durchgeführt. Ein Chip, das zwei Kammern (5,2 mm lang, 750  $\mu\text{m}$  breit, 1,5 mm tief) aufweist, von denen jede an jedem Ende mit einem Eingangsloch über einen Kanal verbunden ist (3,25 mm lang, 100  $\mu\text{m}$  breit, 20  $\mu\text{m}$  tief), wurde zum gleichzeitigen Testen der spermientötenden Aktivität von Nonoxinol-9 und C13-G (Biosyn, Inc. PA) verwendet. Die vier Kanäle wurden mit

HTF-BSA-Lösung (Kanal #1, Kontrolle), 0,005 % (Kanal #2), 0,0125 % (Kanal #3) und 0,05 % (Kanal #4) Nonoxinol-9 (oder C13-G) jeweils gefüllt. Eine Samen-Probe wurde in jeder Kammer platziert und das Vordringen von Sperma in die aneinander-grenzenden Kanäle überwacht, indem das Mikroskop verwendet wurde. Die Anzahl von Spermien, die in den Kanälen beobachtet wurden, war in der folgenden Ordnung gemäß abnehmender Spermien-Anzahl: Kanal #1 > #2 > #3 > #4. Die meisten Spermien wurden in dem Kontroll-Kanal beobachtet und keine wurden in dem Kanal #4 beobachtet, der Nonoxinol-9 oder C13-G bei der optimalen Konzentration für eine spermizidale Wirkung enthielt.

#### Beispiel 7

Eine morphologische Überprüfung eines selbst-beweglichen Spermias, wurde in einem mesoskalischen Fließ-System durchgeführt. Ein Chip, der zwei Kammern (5,2 mm lang, 750  $\mu$ m breit, 1,5 mm tief) aufweist, von denen jede mit jedem Ende mit einem Eintritts-Loch durch einen Kanal (3,25 mm lang, 100  $\mu$ m breit, 20  $\mu$ m tief) verbunden ist, wurde verwendet. Die Kanäle wurden mit HTF-BSA-Lösung und einer Samen-Probe gefüllt, die an die zentrale Kammer angelegt bzw. angebracht wurde. Der Chip wurde in eine feuchte Umgebung für 10 min platziert. Die Oberflächenlösung wurde von den Löchern an jedem Ende des Chips entfernt und auf einem Glas-Objekträger platziert (der zuvor mit Ethanol gewaschen wurde). Der Träger wurde bei 40 °C getrocknet und dann gefärbt, indem Wright Giemsa-Färbemittel (Curtin Matheson Scientific, Inc., Houston, TX) verwendet wurde. Das Sperma, das von der zentralen Kammer bis zu dem Ende des Kanals und in das Loch gewandert ist, wies eine normale morphologische Erscheinung auf.

#### Beispiel 8

Die Wechselwirkung einer Sperma-Probe mit Zervikalschleim in einem mesoskalischen Fließ-System wurde in einem Chip überprüft, der zwei Kammern (5,2 mm

lang, 750  $\mu\text{m}$  breit, 1,5 mm tief) aufweist, von denen jede an jedem Ende mit einem Eintritts-Loch durch einen Kanal (3,25 mm lang, 100  $\mu\text{m}$  breit, 20  $\mu\text{m}$  tief) verbunden ist. Die Kanäle wurden mit HTF-BSA-Lösung und einer Zervikalschleim-Probe, die ungefähr am 14. Tag des Menstruationszyklusses der Patientin gesammelt wurde) gefüllt, die in jede der zentralen Kammern plaziert wurden. Es wanderte kein Sperma in den Zervikalschleim und jene, die eindrangen, starben, wie vorherzusehen war, da Zervikalschleim zu dieser Zeit während des Menstruationszyklusses als gegenüber Sperma feindlich bekannt ist. Moghissi et al., Am. J. Obstet. Gynecol., 114: 405 (1972).

#### Beispiel 9

Ein Test betreffend die Wechselwirkung von Hyaluronsäure mit einer Sperma-Probe wurde durchgeführt, um die zervikale Wechselwirkung einer Sperma-Probe zu beurteilen. Der Test wurde in einem Chip durchgeführt, der zwei Kammern (5,2 mm lang, 750  $\mu\text{m}$  breit, 1,5 mm tief) aufweist, von denen jede an jedem Ende mit einem Eintritts-Loch durch mesoskalische Fließ-Kanäle #1, #2, #3 und #4 (3,25 mm lang, 100  $\mu\text{m}$  breit, 20  $\mu\text{m}$  tief) verbunden ist. Der Kanal #1 war ein Kontroll-Kanal. Die Kanäle wurden mit HTF-BSA-Lösung und Lösungen von Hyaluronsäure (Sigma) in HTF-BSA (Kanäle #2, #3, #4, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL und 1,3 mg/mL, jeweilig) gefüllt. Eine Samen-Probe wurde in jeder der zentralen Kammern plaziert. Es wanderte kein Sperma in den Kanal #2, der 5 mg/mL Hyaluronsäure enthält, aber das Ausmaß der Wanderung nahm mit der Abnahme der Konzentration von Hyaluronsäure in den Kanälen #3 und #4 zu.

#### Beispiel 10

Ein Immuno-Tröpfchen-Test bzw. Immuno-Kügelchen-Test bezüglich der Gegenwart von IgG-Antikörpern in einer Sperma-Probe wurde durchgeführt. Immuno-Kügelchen (BioRAD, Richmond, CA), bei denen es sich um Mikrokügelchen bzw. Perlen, die

mit einem Antikörper bezüglich humanem IgG überzogen wurden, handelt, wurden auf 1 mg/mL in einer HTF-BSA-Lösung (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) verdünnt. Ein Mikrokanal (250  $\mu$ m breit, 20  $\mu$ m tief und 10 mm lang) in einem Glas-Silizium-Chip wurde mit einer Probe der Immuno-Kügelchen-Lösung gefüllt und eine Samen-Probe (ca. 1,2  $\mu$ L) wurde an den Kanal-Eingang angebracht bzw. angelegt. Eine Agglutination von Sperma durch die Immuno-Kügelchen aufgrund der Gegenwart von Antikörpern in der Sperma-Probe wurde in dem Kanal beobachtet. Zur Kontrolle wurde das Experiment auf einem Glas-Objektträger durchgeführt, indem größere Volumen des Immuno-Kügelchen-Reagens und der Samen-Probe verwendet wurden, und dies war ebenso positiv (eine Agglutination wurde beobachtet).

PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung (10) zur in vitro-Befruchtung, wobei die Vorrichtung umfaßt:

ein festes Substrat (14), das so durch Mikrofabrikation hergestellt ist, daß es definiert:

ein Eieinnistkammer (22D);

eine Spermaeinlaßöffnung (22C);

einen länglichen Kanal (20B), der ein Spermamedium enthält, wobei zumindest ein Abschnitt des Kanals eine Querschnittsabmessung von etwa 0,1 bis 500  $\mu\text{m}$  aufweist und der Kanal eine Verbindung zwischen der Eieinnistkammer und der Spermaeinlaßöffnung darstellt, die kompetitive Spermienwanderung von der Einlaßöffnung zur Einnistkammer für die Eibefruchtung ermöglicht.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, worin der Kanal eine Verzweigungsstruktur umfaßt.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, worin die Vorrichtung eine Vielzahl dieser Mesoskalenkanäle umfaßt.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, worin jeder der Kanäle die gleiche Länge aufweist.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin der längliche Kanal einen Primärkanal und einen Fraktalbereich umfaßt, der Verzweigungen aufweist, die zu mehreren Sekundärkanälen führen.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, worin die Sekundärkanäle im Fraktalbereich eine gegenüber dem Primärkanal verringerte Querschnittsfläche aufweisen.

7. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das Spermamedium aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Säugetiereileiterflüssigkeit, Zervikalschleim und einem Puffer besteht.
8. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin der längliche Kanal gekrümmt oder gewunden ist.
9. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters Mittel umfaßt, um ein Ei in der Einnistkammer aus dem Substrat auszustoßen.
- 10. Vorrichtung nach Anspruch 9, worin das Mittel zum Austoßen hydraulische Ausstoßmittel umfaßt.
11. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters Mittel umfaßt, die einen optischen Weg durch die Vorrichtung hindurch zur Eieinnistkammer definiert, um die visuelle Beobachtung des Eies zu ermöglichen.
12. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das feste Substrat so durch Mikrofabrikation hergestellt ist, daß ein Spermaablagerungsreservoir definiert wird, das mit der Einlaßöffnung in Verbindung steht.
13. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters Filtermittel umfaßt, die zwischen der Einlaßöffnung und der Einnistkammer angeordnet sind.
14. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters ein Pufferreservoir umfaßt, das sich in Flüssigkeitsverbindung mit dem Kanal befindet, um die Entwässerung innerhalb des Substrats zu verringern.
15. Vorrichtung (10) zum Analysieren einer Spermaprobe, umfassend:

ein festes Substrat (14), das so durch Mikrofabrikation hergestellt ist, daß es definiert:

eine Spermaprobeneinlaßöffnung (16A); und ein Mesoskalenkanalsystem, umfassend:

einen gekrümmten oder gewundenen Kanal (40), der mit der Einlaßöffnung in Verbindung steht und ein Spermamedium enthält, wobei zumindest ein Abschnitt des gekrümmten oder gewundenen Kanals eine Querschnittsabmessung von etwa 0,1 bis 500  $\mu\text{m}$  aufweist; und

Mittel zum Detektieren der Wanderung der Spermien durch das System.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, worin das Kanalsystem einen mit der Einlaßöffnung in Verbindung stehenden Primärkanal und zu mehreren Sekundärkanälen führende Verzweigungen umfaßt.

17. Vorrichtung nach Anspruch 16, worin die Sekundärkanäle im Vergleich zum Primärkanal eine verringerte Querschnittsfläche aufweisen.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, worin ein Kanal im Substrat bezogen auf eine horizontale Ebene in einem Winkel angeordnet ist.

19. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das feste Substrat durch Mikrofabrikation hergestelltes Silizium umfaßt.

20. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters ein Gerät zur Verwendung in Kombination mit dem Substrat umfaßt, wobei das Gerät umfaßt:

Mittel zum Halten des Substrats;

Fluideingabemittel, die mit einer Einlaßöffnung auf dem Substrat ineinanderpassen; und Pumpmittel zum Zuführen von Fluid zu einem Kanal im Substrat, wenn es im Haltemittel gehalten wird.

21. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, die weiters ein Gerät zur Verwendung in Kombination mit dem Substrat umfaßt, wobei das Gerät umfaßt:

Mittel zum Halten des Substrats; und

optische Mittel zum Betrachten des Inhalts des Mesoskalenkanalsystems im Substrat.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, worin die optischen Mittel eine Vergrößerungsoptik und eine Videokamera umfassen, und worin das Gerät weiters umfaßt:

einen Kippmechanismus zum manuellen Einstellen des Winkels und der Position der Vorrichtung; und

einen Videobildschirm zum Betrachten des Inhalts des Kanalsystems.

23. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin innerhalb zumindest eines Abschnitts des Kanals die Kanalbreite und die Kanaltiefe jeweils zwischen 0,1  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  betragen.

24. Vorrichtung nach Anspruch 23, worin die Kanalbreite in diesem Abschnitt zwischen 2,0 und 300  $\mu\text{m}$  beträgt.

25. Vorrichtung nach Anspruch 23 oder 24, worin die Kanaltiefe in diesem Abschnitt zwischen 0,1 und 100  $\mu\text{m}$  beträgt.

26. Verfahren zur in vitro-Befruchtung eines Eies, umfassend:

(i) das Bereitstellen einer Vorrichtung (10), die ein festes Substrat (14) umfaßt, das so durch Mikrofabrikation hergestellt ist, daß es definiert:

ein Eieinnistkammer (22D);

eine Spermaeinlaßöffnung (22C);

einen länglichen Kanal (20B), wobei zumindest ein Abschnitt des Kanals eine Querschnittsabmessung von etwa 0,1 bis 500  $\mu\text{m}$  aufweist und der Kanal ein Spermamedium enthält und eine Verbindung zwischen der Eieinnistkammer und der Spermaeinlaßöffnung darstellt, was die kompetitive Spermienwanderung von der Einlaßöffnung zur Einnistkammer für die Eibefruchtung ermöglicht;

(ii) das Anordnen eines Eies in der Einnistkammer;

(iii) das Aufbringen einer Spermaprobe auf die Einlaßöffnung; und

(iv) das Zulassen der kompetitiven Wanderung der Spermien von der Einlaßöffnung durch den Kanal zum Ei in der Einnistkammer.

27. Verfahren nach Anspruch 26, worin der längliche Kanal einen Abzweigungskanal umfaßt; und

worin in Schritt (iv) die Spermaprobe kompetitiv durch den Abzweigungskanal wandern gelassen wird.

28. Verfahren nach Anspruch 27, worin der Abzweigungskanal einen Fraktaltbereich umfaßt; und

worin in Schritt (iv) die Spermaprobe kompetitiv durch den Fraktalbereich wandern gelassen wird.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 28, das weiters umfaßt:

(v) das Ausstoßen des Eies aus der Kammer mit Ausstoßmitteln.

30. Verfahren nach Anspruch 29, worin die Ausstoßmittel ein hydraulisches Ausstoßmittel umfassen; und

worin in Schritt (v) das Ei mit dem hydraulischen Ausstoßmittel aus der Kammer im Substrat ausgestoßen wird.

31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, weiters umfassend:

das visuelle Beobachten der Eikammer, um vor Schritt (v) die Befruchtung des Eies in der Kammer zu bestimmen.

32. Verfahren zum Analysieren einer Spermaprobe, umfassend:

(i) das Bereitstellen einer Vorrichtung (10), die umfaßt:

ein festes Substrat (14), das durch Mikrofabrikation so hergestellt ist, daß es definiert:

ein Spermaprobeneinlaßöffnung (16A); und

ein Mesoskalenkanalsystem, das ein Spermamedium enthält und einen Primärkanal (20A) umfaßt, der sich von der Einlaßöffnung weg erstreckt, wobei zumindest ein

Abschnitt des Primärkanals eine Querschnittsabmessung von etwa 0,1 bis 500  $\mu\text{m}$  aufweist;

(ii) das Aufbringen einer Spermaprobe auf die Einlaßöffnung; und

(iii) das Erfassen der Wanderung von Spermien von der Einlaßöffnung durch den Kanal.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 31, worin zumindest ein Abschnitt des länglichen Kanals einen gekrümmten oder gewundenen Kanal aufweist.

34. Verfahren nach Anspruch 32, worin zumindest ein Abschnitt des Mesoskalenkanalsystems einen gekrümmten oder gewundenen Kanal aufweist.

FIG. I

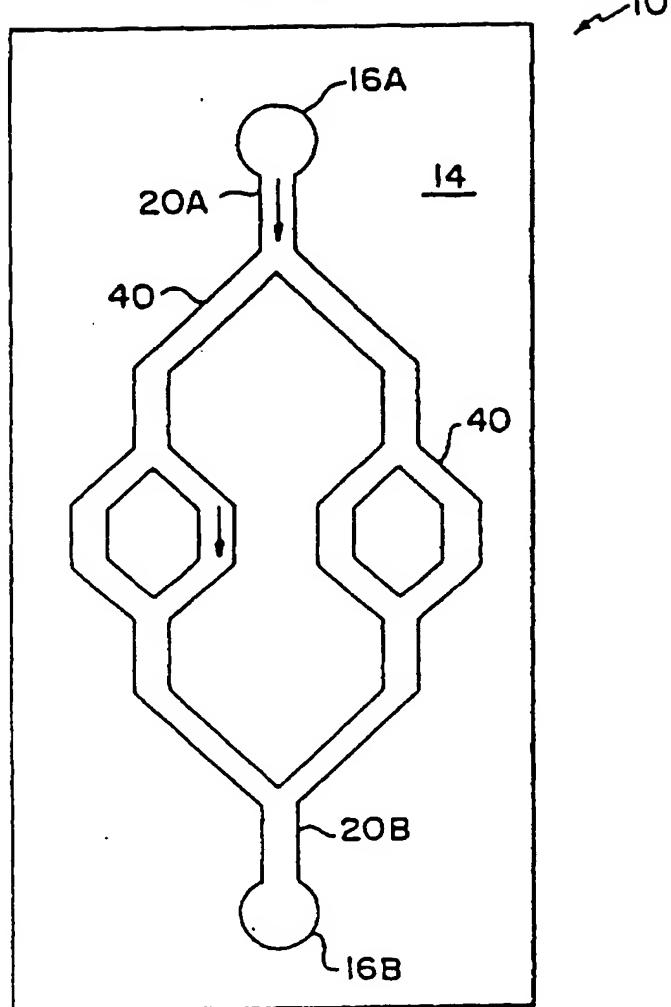


FIG. 2

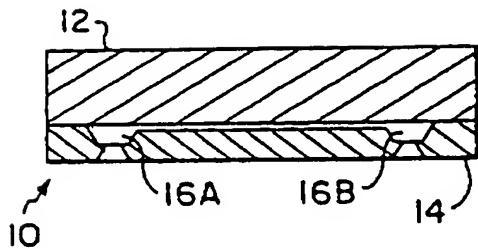


FIG. 3

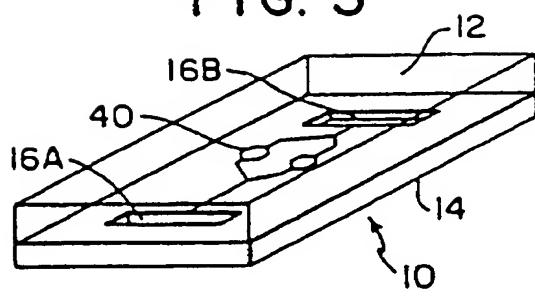


FIG. 4

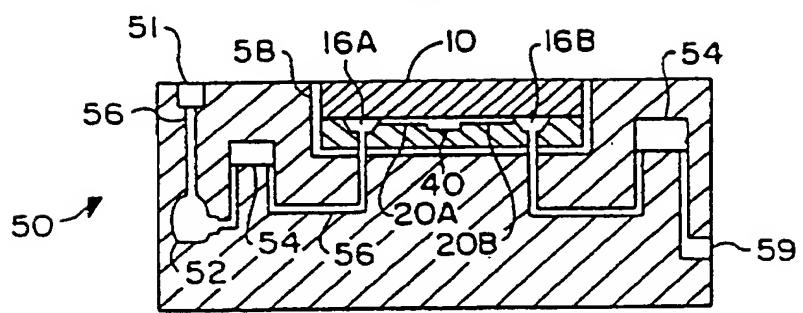


FIG. 5

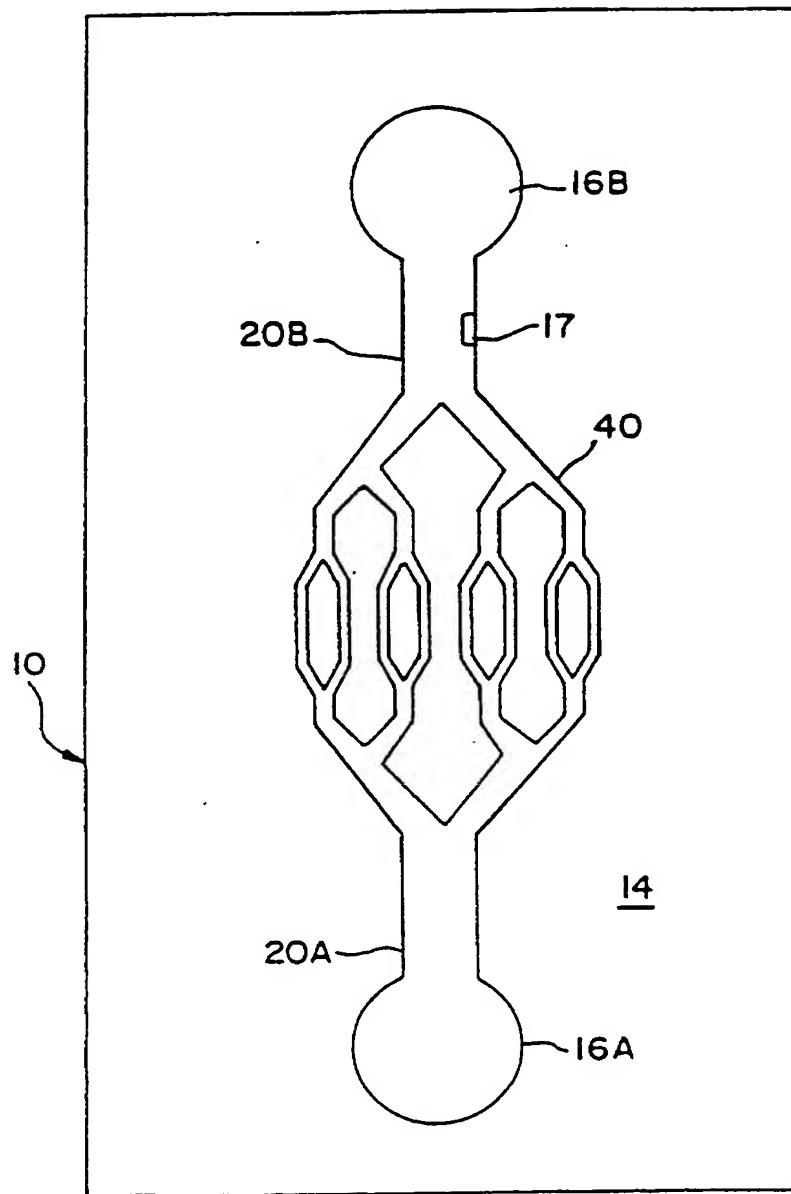


FIG. 6

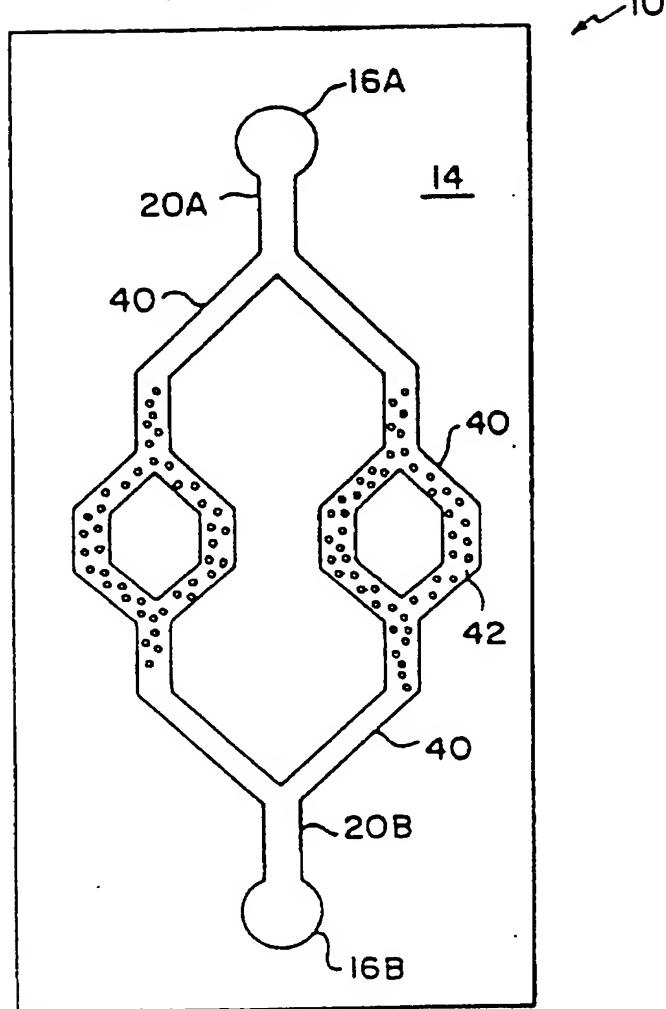


FIG. 7

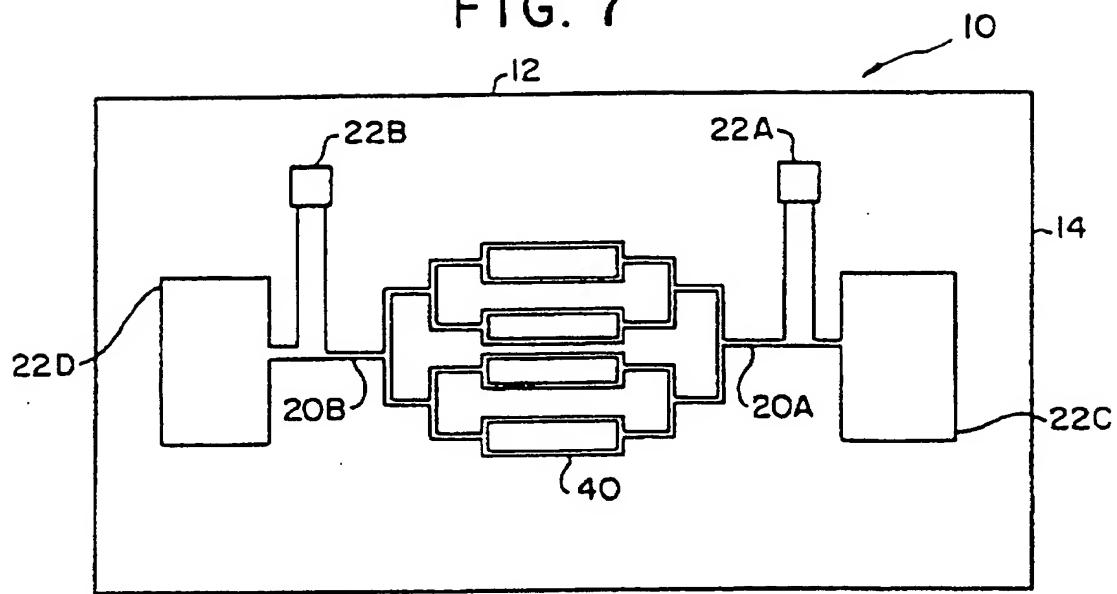


FIG. 8

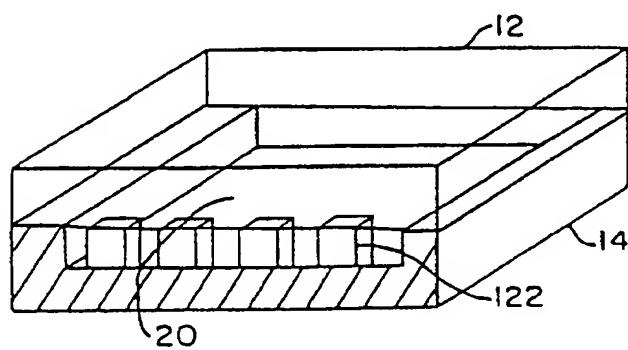


FIG. 9

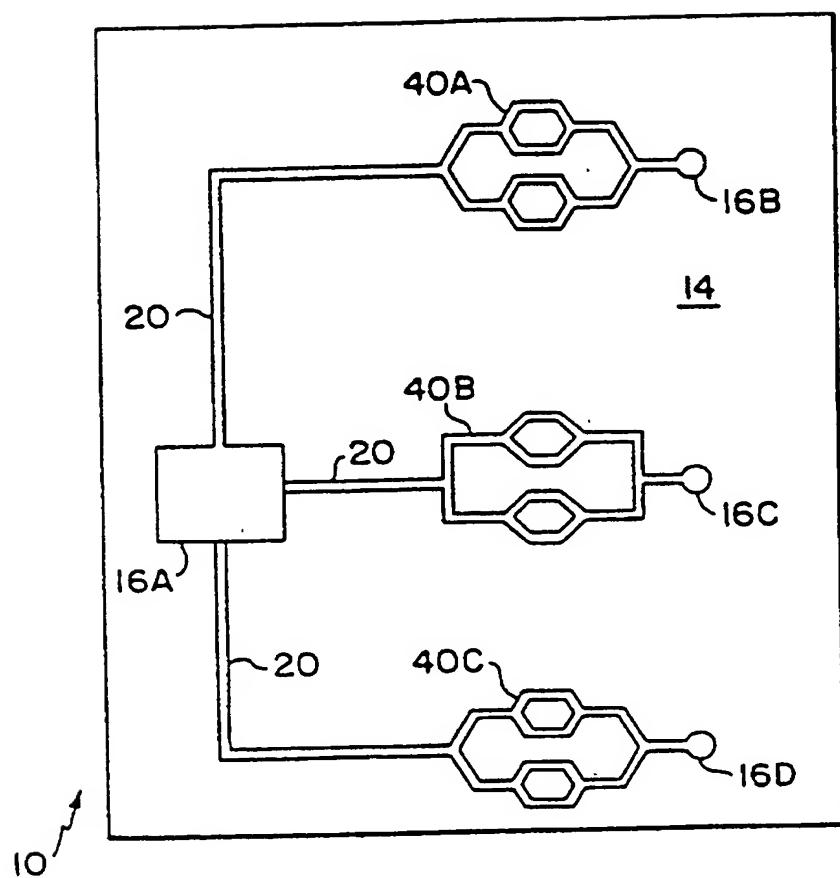


FIG. 10

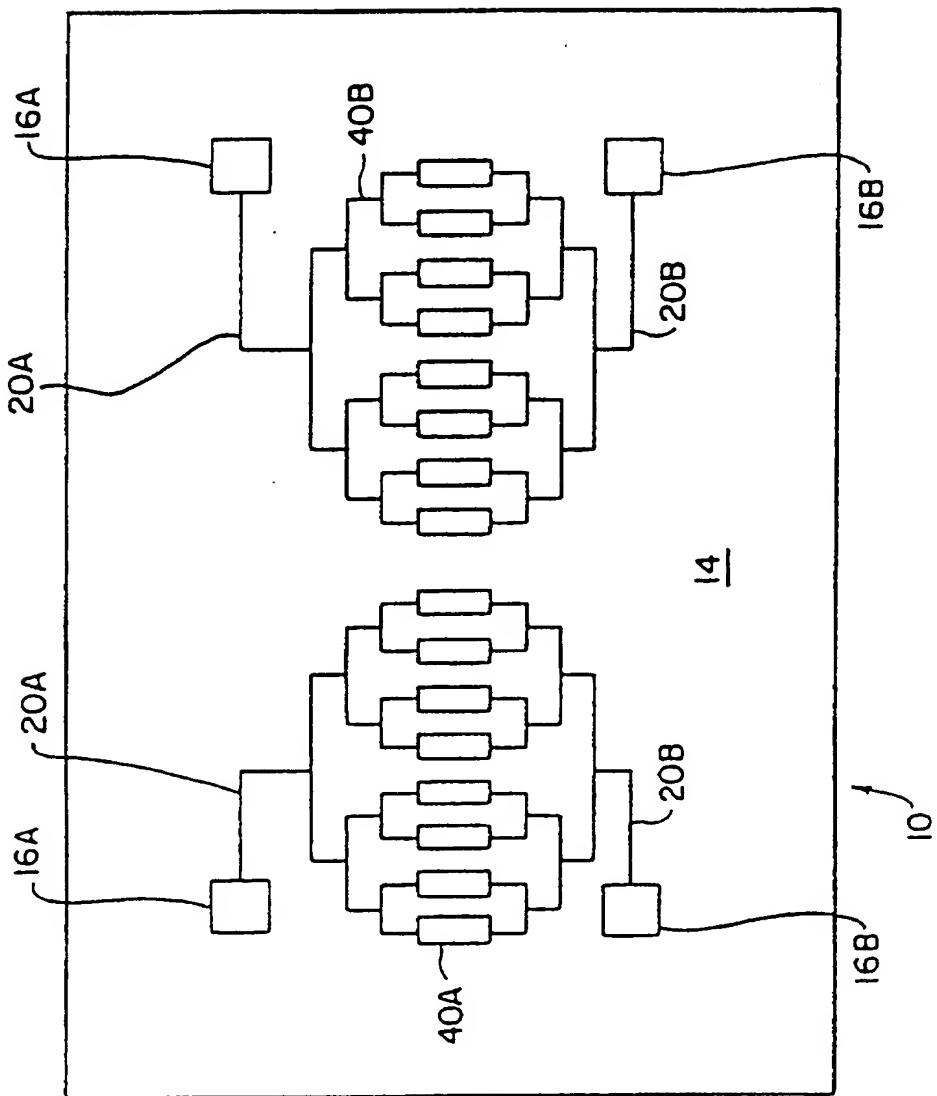


FIG. 12

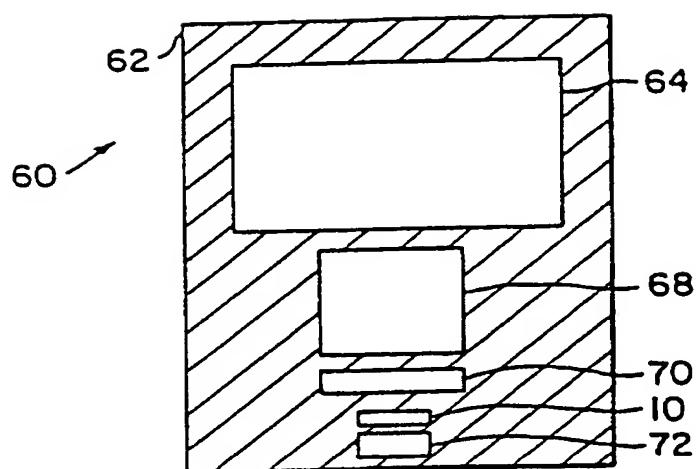


FIG. 11

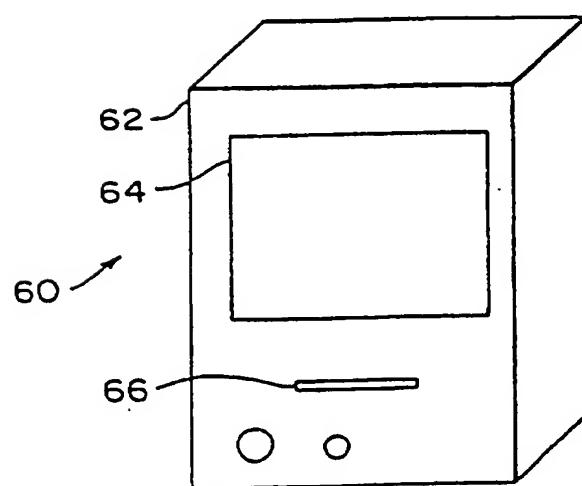


FIG. 13

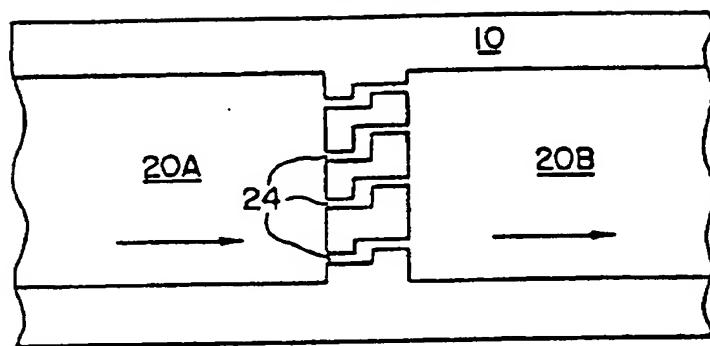


FIG. 14

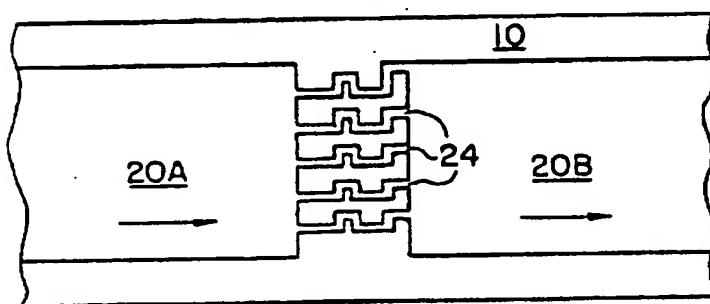
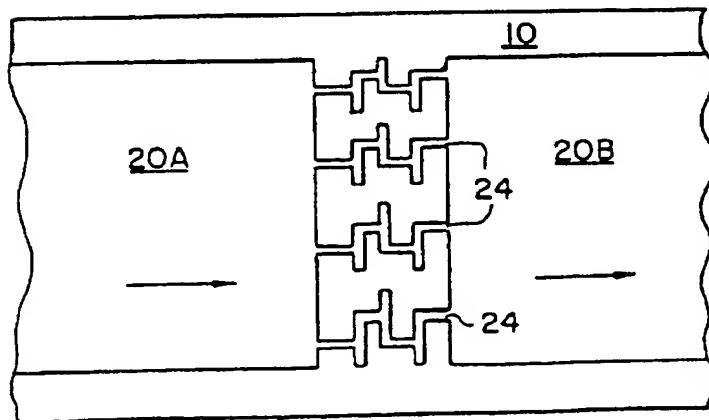


FIG. 15



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**